

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-272453
 (43)Date of publication of application : 24.09.2002

(51)Int.CI.

C12N 1/21
 A61K 38/48
 A61P 7/02
 A61P 9/00
 A61P 35/00
 A61P 43/00
 C12N 9/54
 C12N 15/09
 C12P 21/02
 // C07K 1/18
 (C12N 1/21
 C12R 1:07)
 (C12N 9/54
 C12R 1:07)
 (C12N 15/09
 C12R 1:07)

(21)Application number : 2001-085117

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 23.03.2001

(72)Inventor : HASUMI KEIJI
 NARASAKI RITSUKO
 KURIBAYASHI HARUSHIGE
 SATO TSUTOMU

(54) NEW ANGIOSTATIN-CONVERTING ENZYME, MICROORGANISM PRODUCING THE ENZYME, METHOD FOR PRODUCING THE ENZYME, AND METHOD FOR PRODUCING ANGIOSTATIN AND ACTIVE SERINE PROTEASE BY UTILIZING THE ENZYME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new angiostatin-converting enzyme, a microorganism producing the enzyme, a method for producing the enzyme, and the application as an activating agent of the enzyme.

SOLUTION: The producing microorganism is *Bacillus megaterium* A9542 strain (accession number: FERM P-18268). *Bacillomycin MA* of the enzyme produced by the microorganism, the gene of the microorganism, a neovascularization inhibitor containing an angiostatin-like fragment produced from a plasminogen by the action of the enzyme as an active ingredient, the activator of a plasma serine protease group containing the enzyme as an active ingredient, and a method for producing an angiostatin-like molecule and mini- plasminogen-like molecule by subjecting a plasminogen to limited digestion by using the enzyme are also provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.09.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

- [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-272453

(P2002-272453A)

(43)公開日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 12 N 1/21		C 12 N 1/21	4 B 0 2 4
A 61 K 38/48		A 61 P 7/02	4 B 0 5 0
A 61 P 7/02		9/00	4 B 0 6 4
9/00		35/00	4 B 0 6 5
35/00		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-85117(P2001-85117)

(22)出願日 平成13年3月23日 (2001.3.23)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月5日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌75巻
臨時増刊号」に発表

(71)出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72)発明者 遠見 恵司
東京都稻城市向陽台5-9リペレ向陽台2
-301
(72)発明者 奈良崎 律子
東京都府中市天神町4-3-17ブランシェ
佳寿101
(72)発明者 栗林 春茂
長崎県諫早市原口町816-7
(74)代理人 100110168
弁理士 宮本 晴視

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なアンジオスタチン変換酵素、該酵素の生産菌、該酵素の製造方法、該酵素の利用によるアンジオスタチンおよび活性型セリンプロテアーゼの製造

(57)【要約】

【課題】 新規なアンジオスタチン変換酵素、該酵素の生産菌、該酵素の製造方法および該酵素の活性化剤としての使用の提供

【解決手段】 バチラス メガテリウム A 9 5 4 2 株
(受託番号: F E R M P - 1 8 2 6 8)、該微生物が產生する酵素であるバシロライシンMA、該微生物の遺伝子、該酵素の作用によりプラスミノーゲンから生成するアンジオスタチン様断片を有効成分とする血管新生抑制剤、前記酵素を有効成分とする血漿セリンプロテアーゼ群活性化剤、前記酵素を用いてプラスミノーゲンを限定分解してアンジオスタチン様分子およびミニプラスミノーゲン様分子を製造する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチラス メガテリウム A9542株
(受託番号: F E R M P - 1 8 2 6 8)。

【請求項2】 配列番号1に記載の細菌バチラス メガテリウム A9542のバシロライシンMA遺伝子。

【請求項3】 配列番号1および2に記載のアミノ酸配列を持つ、プラスミノーゲンを基質としてアンジオスタチン様プラスミノーゲン断片を生成させる新規な酵素。

【請求項4】 請求項3に記載の酵素の作用により生成するプラスミノーゲン断片を有効成分とする血管新生阻害剤。

【請求項5】 血管新生の阻害剤としての有効成分がプラスミノーゲンのG I u¹からS e r 441のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分とするものであることを特徴とする請求項4に記載の血管新生阻害剤。

【請求項6】 血管新生の阻害剤としての有効成分として更に、プラスミノーゲンのP h e 75からS e r 441、G I u¹からV a l 449、およびP h e 75からV a l 449のアミノ酸配列を有するフラグメントからなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする請求項5に記載の血管新生阻害剤。

【請求項7】 請求項3に記載の酵素の作用により生成するプラスミノーゲンのV a l 442からA s n 791のアミノ酸配列を有する断片を主たる有効成分とする血栓溶解剤。

【請求項8】 請求項3に記載の酵素を有効成分とする血しょうセリンプロテアーゼ群活性化剤。

【請求項9】 請求項3に記載の酵素が活性化する成分が、プロトロンビン、プロテインC、プロウロキナーゼ、または血液凝固因子Xであることを特徴とする請求項5に記載の活性剤。

【請求項10】 バチラス メガテリウム A9542株の培養液を、イソプロピルアルコール存在下にCMセルロースイオン交換クロマトグラフィーにかける工程を含むことを特徴とする請求項3に記載の酵素を製造する方法。

【請求項11】 プラスミノーゲンを請求項3に記載の酵素により限定分解してプラスミノーゲンのG I u¹からS e r 441のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分として含む血管新生阻害剤有効成分を製造する方法。

【請求項12】 プラスミノーゲンを請求項3に記載の酵素により限定分解してプラスミノーゲンのV a l 442からA s n 791のアミノ酸配列を有するフラグメント断片を主たる成分として含む血栓溶解剤有効成分の製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細菌バチラス メガテリウム A9542株 (受託番号F E R M P - 1 8

2 6 8)、該細菌を起源とする新規なプロテイン(酵素)、該酵素の作用により生成するプラスミノーゲン断片を有効成分とする血管新生阻害剤(以下、血管新生阻害に有効なプラスミノーゲン断片をアンジオスタチン様分子という。)または血栓溶解剤(以下、該血栓溶解に有効なプラスミノーゲン断片をミニプラスミノーゲン様分子という。)、該酵素を有効成分とする血しょうセリンプロテアーゼ群活性化剤、更に該酵素を用いてプラスミノーゲンを基質としてアンジオスタチン様分子およびミニプラスミノーゲン様分子を製造する方法などに関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、血管新生抑制剤が新しいガン治療戦略として注目されている。癌における血管新生の研究は最近非常に注目されている。癌細胞が増殖して1~2 mm³の大きさになると、さらに大きく成長するために多くの酸素と栄養が必要となることが解明されている。癌細胞は血管新生因子とよばれる血管新生を促す因子を放出し、近くの血管から新しい血管の造成を促して腫瘍内に血管を引き込むことにより、血液内の酸素と栄養物を利用し爆発的に増殖速度を増すことができるようになる。また、この腫瘍内微小血管を経由して遠隔転移が可能となる。

【0003】 前記癌成長における血管新生の役割を見ると、癌の血管新生を阻害することは、癌の増殖、浸潤、転移を抑制することにつながることは容易に理解できる。事実、多くの血管新生を阻害する薬剤が抗腫瘍剤として開発され、提案もされている(特開平4-178328号公報、特開平6-234645号公報、特開平10-81631号公報など)。しかしながら、今までに血管新生阻害剤として承認された薬剤はない。血管新生を標的とする治療薬の開発は原発腫瘍の増大のみならず転移を阻止する可能性を有する。その一つであるアンジオスタチン(angiotatin)は血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を選択的に抑え、酸素や栄養分の供給を断ち、腫瘍の休止状態を引き起こすことが知られるところとなった(米国のフォークマン博士らにより、アンジオスタチンが発見されこのような概念が提唱された。)。また、アンジオスタチンは血管新生促進物質よりも循環血中での半減期が長いため原発巣から離れた転移巣では阻害物質濃度が優位となり、転移巣の成長を抑制していると考えられている。さらに、内皮細胞のアポトーシスも増加させることも知られている。アンジオスタチンは、線溶因子であるプラスミノーゲンのクリンゲル(kringle)1~4までを含む分子量約38 kDaのペプチドである。従来、AGはインピトロではプラスミノーゲンのエラスターーゼ(elastase)による限定分解や、プラスミノーゲンアクチベータを作用させ、プラスミンへと誘導した後、グルタチオン(glutathione)などの還元剤を作用させる

ことにより生産される。また、*in vivo*では数種のマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) によりアンジオスタチン変換は起こると考えられている。従来のアンジオスタチンを生産する技術は、(1) 前記タンパク質を分解するエステラーゼを用いる方法、および(2) 組み換えDNA技術を用いて、大腸菌で生産させる方法に大別することができる。しかしながら、前記従来の生産方法によると、アンジオスタチンへの変換の選択性が低い、得られたアンジオスタチンの活性の再現性が良くない、精製が難しいなどの問題点があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、基本的には前記アンジオスタチンの作用をする物質（アンジオスタチン様分子）、および該物質を生産する方法、特に前記プラスミノーゲンを酵素により分解する方法の問題点、すなわち、基質特異性を改善したアンジオスタチンへの変換酵素を見出すことである。本発明者は、前記改善された酵素を見出すべく、種々の土壌から、微生物の代謝物として放出されるタンパク質の中に前記所望のアンジオスタチンへの変換特性を持ったものはないかと探索した。そして、東京都国分寺市東元町の土壌から、前記基質特異性を持つタンパク質を代謝物として放出する細菌を見出した。そして、本発明者は該細菌をA9542とし、産業技術総合研究所生命工学研究所の特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18268として、平成13年3月21日に受託された。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明の第1は、配列番号1に記載の塩基配列を持つタンパク質を代謝する細菌バチラス メガテリウム A9542（受託番号FERM P-18268）であり、第2の発明は、配列番号1で表される前記細菌の遺伝子の塩基配列であり、本発明の第3は、前記細菌が代謝物として放出する、プラスミノーゲンを基質としてアンジオスタチン様断片を生成させる配列番号1および2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素であり、本発明の第4は、前記配列番号1および2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素の作用により生成するプラスミノーゲン断片を有効成分とする血管新生阻害剤であり、好ましくは、血管新生の阻害剤としての有効成分がプラスミノーゲンのGlu¹からSer⁴⁴¹のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分とするものであることを特徴とする前記血管新生阻害剤であり、より好ましくは、血管新生の阻害剤としての有効成分として更に、プラスミノーゲンのPhe⁷⁵からSer⁴⁴¹、Glu¹からVal⁴⁴⁹、およびPhe⁷⁵からVal⁴⁴⁹のアミノ酸配列を有するフラグメントからなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする前記血管新生阻害剤である。発明の第5は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素の作用により生成するプラスミ

ノーゲンのVal⁴⁴²からAsn⁷⁹¹のアミノ酸配列を有するフラグメント断片を主たる有効成分とする血栓溶解剤である。発明の第6は、前記配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素を有効成分とするプロトロンビン、プロテインC、プロウロキナーゼ、血液凝固因子Xなどの血しょうセリンプロテアーゼ群の活性化剤であり、本発明の第7は、前記細菌の培養液をイソプロピルアルコール存在下にCMセルロースイオン交換クロマトグラフィーにかける工程を含むことを特徴とする配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素質を製造する方法である。本発明の第8は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素を用いて、プラスミノーゲンからアンジオスタチン様断片またはミニプラスミノーゲン様断片を製造する方法である。

【0006】

【本発明の実施の態様】本発明をより詳細に説明する。
A. 本発明の細菌は東京都国分寺市東元町で採取した土壌から分離して得られたものであり、実施例中で記述する培養条件で培養し、培養液からプラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片への変換を触媒する酵素を生産する微生物を見出し、以下のように同定された。

B、菌学的特徴

1. 代謝生産物として、配列番号1および2に記載の酵素を產生する。
2. 顯微鏡観察から桿菌である。
3. 菌の大きさは、約3~6×0.8~1.0 μmである。
4. グラム染色により紫色に染まりグラム陽性である。
5. 芽胞染色から胞子形成菌である。
6. カタラーゼテストから、カタラーゼ陽性である。
7. 嫌気条件で生育できないから、好気性である。
8. 寒天培地での糖 (D-(+)-グルコース、L-(+)-アラビノース、D-(+)-キシロース、D-(-)-マニトール) からの酸性産生する。以上の特性から、A9542株は、*Bacillus megaterium*と一致する。したがって、本菌を、*Bacillus megaterium* A9542株とした。

【0007】9. 本菌の遺伝子はバチラス メガテリウム npRE 遺伝子と97%の相同性を示した。本菌は、翻訳産物レベルにおいてバシロライシンに対して10アミノ酸の相違が見られるアミノ酸配列（配列番号2に示すとおりである）のタンパクを產生する。そこでA9542株の前記翻訳産物をバシロライシンMAとした。

【0008】C、本菌の生育条件

1. 培地組成：ブレインハートインフュージョン（ニッスイ 05508）、牛脳エキス末21%、ペプトン2.6%、ハートエキス末2.3%、グルコース5.7%、NaCl 1.4.3%，リン酸水素ーカリウム7.

7 %

2, 培地 pH : 7. 0,

3, 培地の殺菌条件 121℃、15分、

4, 培養温度 : 28℃

D, 本発明の菌は、経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所特許生物寄託センター受託番号(FERM P-18268)として受託されている。

【0009】

【実施例】実施例1

菌株の分離と培養

1, 分離

東京都国分寺市東元町で採取したの土壤1gを、滅菌水5mLに加え、良く攪拌してから、さらに10⁻⁴(w/v)に希釈し、以下の操作により培養し、プラスミノーゲンからアンジオスタチン様断片を生成する活性を代謝物として放出する微生物を探査することにより実施した。

【0010】選択対象の菌の分離にはスターーカゼインー寒天培地(コーンスターーチ1%、カゼイン0.03%、KNO₃ 0.2%、NaCl 0.2%、K₂HPO₄ 0.2%、MgSO₄·7H₂O 0.005%、CaCO₃ 0.002%、FeSO₄·7H₂O 0.01%、寒天1.5%、ニスタチン(nystatin) 0.005%)を、用いた。希釈液0.1mLをシャーレ中の培地上に塗布し、28℃で6日間培養した。生じたコロニーを釣菌し、スターーカゼインー寒天培地からなる保存用スラント上において、28℃で適当な生育状態になるまで培養し、その後4℃で保存した。

【0011】2, 液体培養

選択対象の菌の液体培養には以下の培地を用いた。グルコース1%、コーンスターーチ3%、大豆ミール(soybean meal)1%、ペプトン0.5%、イースト抽出物(yeast extract)0.5%、CaCO₃ 0.2%、CB442 0.01%、pH 7.0。液体培地10mLの入った試験管(21×210mm)に保存用スラント上から白金耳を用いて植菌し、28℃で6日間、振とう培養(220ストローク/分)を行った。

【0012】実施例2

プラスミノーゲンからアンジオスタチン様断片を生成する代謝産物を生産する微生物の選択

プラスミノーゲンからアンジオスタチン様断片を生成する活性を生産する微生物の探索には、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) [Nature 227, 680-685 (1979)] を用いた。微生物代謝産物の90%メタノール抽出物を1μL乾固して、それに放射ラベルしたプラスミノーゲン(125I-Glu-P1g)(最終濃度100nM、20000cpm)を5μL、uPA(ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性剤)

(最終濃度200単位/mL)を5μLずつ加えて、TBS/Tバッファー(50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.01%(w/v) Tween 80, pH 7.4)中で37℃、30分間インキュベートした。その後サンブルバッファー(3.6% SDS, 3.6%メルカプトエタノール, 0.08%プロモフェノールブルー, 900mg/mL 尿素)を10μL加え、湯浴中で60℃、30分間処理、それをSDS-10% gelにアプライして泳動後、固定、乾燥を行い、オートラディオグラフィにかけてバンドのパターンを見た。プラスミノーゲンとuPAのみを反応させたものを対象試料とした。本方法により、土壤から分離した約1,500株の放線菌、細菌、真菌の培養液をスクリーニングした結果、バチラス メガテリウム A9542株の培養抽出液に強い活性を認めた(図1の2.)。図1は、1は微生物培養抽出液を含まない反応(対照)で得られた結果であり、2はバチラス メガテリウム A9542株の培養抽出液を含むで得られた結果であり、3は本発明の菌株以外のいくつかの菌の培養抽出液を含む反応で得られた結果を示す。

【0013】実施例3

バチラス メガテリウム A9542株の培養液からの配列番号1および2のアミノ酸配列を持つタンパク質(バシロライシンMA:BLMA)の精製

上記の液体培地100mLを含む500mL容三角フラスコでバチラス メガテリウム A9542株を28℃、6日間、振とう培養後、培養液3Lをセライト(濾液の通過を容易にするための助剤)を用いて濾過し、その濾液1LをH₂Oで5Lに希釈し、イソプロピルアルコールを最終濃度5%(v/v)と成るように添加した後、20mM、MES(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)-NaOH(pH 6.5)/5%イソプロピルアルコールで平衡化したゲル400mLのカルボキシルメチルセルロース(CM-Cellose、生化学工業株式会社)カラムに流速1.5mL/minでアプライした。同じバッファー600mLで洗浄した後、20mM、MES-NaOH(pH 6.5)/5%イソプロピルアルコール/0.2M NaClで溶出した。その溶出画分を60mLずつ分画し、活性のあった画分を集めた。その純度をSDS-PAGEで確認(図2)し、精製品90mgを得た。なお、BLMAは本菌から分泌される際に限定分解を受け、本製造方法で得られる酵素蛋白質は、配列番号1に記載のアミノ酸番号Val1からGln317までの配列をもつ分子である。しかし、本発明によるBLMAは、配列番号1に記載の配列のPro-1からGln-254のいかなる部分をさらに含む分子であってもよい。

【0014】実施例4

BLMAによるプラスミノーゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノーゲン様断片の生成(図3)

【0015】プラスミノーゲン (Glu-Ptg) を基質とするBLMAによる限定分解について観察した (測定: SDS-PAGE)。6 μLのGlu-Ptg (最終濃度2 μM)、6 μLのBLMA (最終濃度0, 3, 7, 37 nM) をCaCl₂ (最終濃度1 mM) を含むTBS/Tバッファー中で37°C、60分間インキュベートし、その後、非還元SDS sample buffer (x4) を加え、そのうち15 μLを、SDS-10% gel にアプライした。泳動終了後、Coomassie brilliant blue R-250で染色、乾燥した。その結果、プラスミノーゲンはBLMA濃度依存的に開裂を受けた [BLMA 3, 7 nMで55%, 37 nMで86.5%のプラスミノーゲンが開裂した (図3A)]。またBLMAによるプラスミノーゲン切断を、血清50%、BL濃度0-1000 nMの条件下で行なった。2 μLの125I-Glu-Ptg、3 μLのBLMA (最終濃度0, 10, 100, 1000 nM)、5 μLのヒト血清を加え、37°C、60分間インキュベートし、それに90 μLの水を加えた。そこから5 μLとって、それに5 μL還元SDS sample buffer (x2) を加えた。

パシロライシンMAの作用により生ずるプラスミノーゲン断片のN末端アミノ酸配列

フラグメント	各分析サイクルに出現したアミノ酸 (回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	E (3.9)	P (3.1)	L (1.8)	D (1.3)	D (2.3)
2	E (5.3)	P (5.0)	L (3.0)	D (0.8)	D (1.1)
3	F (3.3)	E (3.3)	K (3.7)	K (2.2)	V (1.8)
4	V (4.4)	V (5.0)	A (9.4)	P (6.1)	P (6.5)
5	L (4.4)	L (7.6)	P (2.3)	X (-)	V (6.0)

【0018】実施例5

BLMAによって生成するプラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片およびミニプラスミノーゲン様断片の製造

2 mLのGlu-Ptg (最終濃度2 μM) に2 mLのCaCl₂ (最終濃度1 mM) と4 mLのBLMA (最終濃度36.8 nM) を加え、TBS/Tバッファー中で37°C、60分間インキュベートし、220 μLのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (最終濃度5 mM) を加えて反応を停止させた。反応液をリジンセファロースカラム (4.6 × 50 mm) にアプライ後、1 mLの50 mMリン酸ナトリウムバッファーで溶出した。ミニプラスミノーゲン様断片はこの画分に回収された。カラムをさらに0.5 MのNaClを含む50 mMリン酸ナトリウムバッファー1 mLで洗浄後、10 mLの0.2 Mイブソロンアミノカプロン酸 (EACA) で溶出した。溶出画分は1 mLずつ分取した。この画分をSDS-PAGEによる分析によりアンジオスタチン様断片の確認をし、目的の断片の検出された画分を集め、PBS (20 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.4) で一晩透析後、凍結乾燥を行なった。これにより、75 μgのアンジオスタチン様断片を得た。なお、上記反応の容量、リジンセファロースカラムのサイ

そのうち5 μLを12.5% gel にアプライし、電気泳動した。泳動終了後一晩オートラジオグラフィにかけ、その後フィルムを現像した。ここでもBL濃度依存的に切断が進みアンジオスタチン様フラグメントが生成することが分かった [図3B、BLMA濃度はそれぞれ、1は0 nM、2は10 nM、3は100 nM、4は1000 nM。)]。

【0016】次に図3Aの切断された断片 (フラグメント、1-5) のN末端アミノ酸配列を同定したところ、表1のようになった。この結果から、BLMAはGlu-PtgのSer441-Vai442 (図3C、矢印3), Leu74-Phe75 (図3C、矢印1), Val1449-Leu450 (図3C、矢印2) を切断し、プラスミノーゲン分子の断片、Glu1-Ser441, Glu1-Val1449, Phe75-Ser441, Phe75-Val1449 (以上アンジオスタチン様断片) ならびにVal1449-Asn791, Leu450-Asn791 (以上ミニプラスミノーゲン様断片) を生成することがわかった。

【0017】

【表1】

ズおよび溶出液の容量は適宜変化させることができ、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0019】実施例6

BLMAによって生成するプラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片による血管内皮細胞の増殖の阻害 (図4)

ウシ毛細血管内皮細胞 (BCE細胞) を24穴組織培養プラスチックプレートに1穴当たり1.25 × 10⁴/mLの密度で1 mMビルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸混液および10%ウシ胎児血清 (FCS) を含むMEM培地0.5 mLを用いて播き込み、CO₂インキュベーターで24時間培養した。培地を5% FCS入りのMEM培地に交換した後、最終濃度が1 μg/mLおよび10 μg/mLになるようにPBSに溶解したアンジオスタチン様断片を10 μL加えた。CO₂インキュベーターで30分間インキュベート後、6 μLのPBSあるいは100 ng/ml 塩基性纖維芽細胞増殖因子 (bFGF) を加え、CO₂インキュベーターで72時間培養した。培養後、培地を取り除き0.5 mLのPBSで2回洗浄し、100 μLの0.05%トリプシン、0.02%EDTA入りPBSを加え、37°C、5分間インキュベート後、10 μLのFCSを入れてトリプシンの反応を停止した。この細胞懸濁液の細胞数を血球計

算盤で数えた。bFGFを添加しないとき、細胞数が2681に対して、bFGF存在下では3712となつた。アンジオスタチン様断片を10μg/mL添加するとbFGF存在下でも細胞数は2337であった。つまり、アンジオスタチン様断片はbFGFに依存した血管内皮細胞の増殖を顕著に阻害することが示された(図4)。

【0020】実施例7

BLMAによって生成するプラスミノーゲンのミニプラスミノーゲン様断片の血栓溶解酵素プラスミンへの効率的変換(図5)

25μLのプラスミノーゲン(最終濃度100nM)あるいはミニプラスミノーゲン様断片に25μLのuPA(最終濃度200単位/mL)、25μLのBLMA(最終濃度0-37nM)および25μLのプラスミン基質S2251(最終濃度100μM)を加え、CaCl₂(最終濃度1mM)を含むTBS/Tバッファー中に37℃、3分ごとに0-60分まで405nmの吸光度を測定した。この反応で、ミニプラスミノーゲン様断片(●)はプラスミノーゲン(○)の5倍以上の速度でプラスミンを生成した(図5)。この結果から、ミニプラスミノーゲン様断片はプラスミノーゲンよりも優れた血栓溶解性を示すことがわかる。

【0021】実施例8

BLMAによるプロウロキナーゼ(pro-uPA)の活性化(図6)

BLMAによるpro-uPAの限定分解とそれに伴う活性化を以下のように観察した。まず、BLMAによってpro-uPAがどのような分子に開裂されているか

パシロライシンMAの作用により生ずるウロキナーゼ断片のN末端アミノ酸配列

フラグメント	各分析サイクルに出現したアミノ酸(回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	I(24.5)	I(28.2)	G(17.9)	G(25.7)	E(9.6)
2	X(-)	N(2.9)	E(2.6)	L(1.9)	H(3.2)
3	S(4.6)	N(6.2)	E(5.2)	L(3.8)	H(8.0)
4	F(2.1)	S(2.0)	N(2.9)	I(2.9)	H(3.5)
5	F(15.8)	S(9.8)	N(11.9)	I(10.4)	H(10.3)

【0023】また、同様の実験を50%血清存在下で行なつた。2μLの125I-pro-uPA(100,000cpm)、3μLのBLMA(図6B、1は0nM、2は10nM、3は100nM、4は1000nM、以上すべて最終濃度)、5μLのヒト血清を加え、37℃、60分間インキュベートし、それに90μLのH₂Oを加えた。そこから5μLをとって、それに5μL還元SDS sample buffer(x2)を加えた。そのうち5μLを12.5%geiにアブライし、泳動した。泳動終了後一晩オートラジオグラフィにかけ、その後フィルムを現像した。その結果、血清非存在下と同様の結果を得た(図6B)。

【0024】BLMAによるプロウロキナーゼ(pro-uPA)の活性化

10μLのpro-uPA(最終濃度20nM)、10

を調べるために、開裂パターンと、生じる断片の同定を行なつた。6μLのpro-uPA(最終濃度2μM)、6μLのBLMA(最終濃度0, 3, 7, 110nM)をCaCl₂(最終濃度1mM)を含むTBS/Tバッファー中に37℃、60分間インキュベートし、その後、非還元SDS sample buffer(x4)を加え、そのうち15μLをSDS-10%geiにアブライした。泳動終了後、Coomassie brilliant blue R-250で染色、乾燥した。さらに、ここで生じたフラグメントのN末端アミノ酸配列を同定した。タンパク質をSDS-PAGEで分画後、PVDF膜(PALL BIOSUPPORT GROUP FLUOROTRANS)へ転写した。膜をCoomassie brilliant blue R-250で染色、メタノールで脱色した後、目的のバンドを切り出し、476Aプロテインシーケンサー(Applied Biosystems)で分析した。BLMA 3.7nMでpro-uPAの活性化開裂部位であるLys 158-Ile 159間の切断が起り(図6C中の矢印1)、A鎖(Ser1-Lys 158)とB鎖(Ile 159-Leu 411)が生じた。BLMA 110nMではpro-uPAのすべてが開裂され、さらにA鎖のがTyr 24-Ph 25間で切断され(図6C中の矢印2)、新たなフラグメントSer1-Tyr 24およびPh 25-Lys 158が生じた(図6A, Cおよび表2)。なお、これらの開裂により生ずる分子は互いにジスルフィド結合で連結されている。

【0022】

【表2】

μLのSpectrozyme UK(活性型ウロキナーゼの特異的基質)(最終濃度100μM)、10μLのCaCl₂(最終濃度1mM)、20μLのBLMA(最終濃度0-190nM)を加え、TBS/Tバッファー中に37℃、3分ごとに0-60分まで405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(BIORAD)を用いて測定した。その結果、図6Dに示すように、BLMAはpro-uPAの活性化をもたらすことが示された。

【0025】実施例9

BLMAによる血液凝固第X因子の活性化(図7)

BLMAによる血液凝固第X因子の開裂(図7のB)を以下のように調べた。5μLの血液凝固第X因子(最終濃度2μM)、5μLのBLMA(最終濃度0, 30, 100, 300nM)を加え、CaCl₂(最終濃度1

mM) を含む TBS/Tバッファーで 37°C、120 分間インキュベートした。その後 3.3 μL の還元 SDS-sample buffer (x4) を加え、そのうち 12 μL を、12.5% gel にアプライした。泳動終了後、染色、乾燥を行なった (図 7A)。さらに、生成したフラグメントの N 末端アミノ酸配列を実施例 7 と同様の方法で同定した (表 3)。BLMA は濃度依存的に血液凝固第 X 因子の B 鎖の Asp³⁴-Leu

35 間 (図 7B 中の矢印 1)、および活性化開裂部位である B 鎖の Lys⁵²-Ile⁵³ 間 (図 7B 中の矢印 2) の開裂をもたらした (図 7A, B および表 3)。その結果、B 鎖の Ser¹-Asp³⁴ 断片と、A 鎖と B 鎖の Leu³⁵-Lys²⁵⁴ 断片がジスルフィド結合で連結された分子を生成した。

【0026】

【表 3】

パシロライシン MA の作用により生ずる血液凝固第 X 因子断片の N 末端アミノ酸配列

フラグメント	各分析サイクルに出現したアミノ酸 (回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	X (-)	V (2.4)	A (4.0)	Q (3.2)	A (3.0)
2	L (2.2)	L (2.8)	D (1.5)	F (5.9)	X (-)
3	I (0.6)	V (0.6)	G (2.8)	G (2.6)	Q (0.9)
4	A (9.0)	N (8.4)	S (2.8)	F (9.2)	L (9.0)

【0027】 BLMA による血液凝固第 X 因子の活性化
10 μL 血液凝固第 X 因子 (最終濃度 20 nM)、10 μL の Spectrozyme Xa (活性型血液凝固第 X 因子の特異的基質) (最終濃度 100 μM)、10 μL の CaCl₂ (最終濃度 1 mM)、20 μL の BLMA (最終濃度 0 - 100 nM) を加え、TBS/Tバッファーで 37°C、6 分ごとに 0 - 120 分まで 405 nm の吸光度を測定した。その結果、BLMA は図 7C に示すように血液凝固第 X 因子の活性化をもたらした。

【0028】 実施例 10

BLMA によるプロトロンビンの活性化 (図 8)
BLMA によるプロトロンビンの活性化は、以下の方法で測定した。12.5 μL のプロトロンビン (最終濃度 20 nM)、12.5 μL の Spectrozyme TH (最終濃度 100 μM)、12.5 μL の CaCl₂ (最終濃度 1 mM)、12.5 μL の BLMA (最終濃度 0 - 400 nM) を加え、TBS/Tバッファーで 37°C、6 分ごとに 0 - 120 分まで 405 nm の吸光度を測定した。図 8 に示すように BLMA は濃度依存的にプロトロンビンを活性化した。

<配列の総数> 2

配列番号 1

<210>1

<211>2107

<212>DNA

<213>Bacillus megaterium A9542

<400>1

caacataaaat gattttcata tagtttaaat aggtaaaaaa gacttattgc aaaagggtta 60

ttcttaattt tcataataat aggaatatta aaataatata tagacgtgt aatttttaat 120

tgctataatg ttgctaatta tcacaattga cagaaaaatt gcggtaatta aatttactag 180

ggatagggag aaaaaact 198

atg aaa aag aaa aaa cag gct tta aag gta tta tta tca gtt ggt 243

met Lys Lys Lys Lys Gln Ala Leu Lys Val Leu Leu Ser Val Gly

【0029】 実施例 11

BLMA によるプロテイン C の活性化 (図 9)

12.5 μL のヒトプロテイン C (最終濃度 20 nM)、12.5 μL の BLMA (最終濃度 0 - 40 nM)、12.5 μL の S2336 (活性型プロテイン C に特異的な基質) (最終濃度 100 μM)、12.5 μL の CaCl₂ (最終濃度 1 mM) を加え、TBS/Tバッファーで 37°C、6 分ごとに 0 - 120 分まで 405 nm の吸光度を測定した。その結果、図 9 に示すように、BLMA は濃度依存的にプロテイン C の活性化をもたらした。

【0030】

【発明の効果】以上述べたように、本発明の菌の生産する酵素 BLMA は、プラスミノーゲンを基質として限定分解して、新生血管抑制効果を有するアンジオスタチン様断片、および優れた血栓溶解作用を示すミニプラスミノーゲン様断片を产生する。また BLMA は血漿セリンプロテアーゼ群の活性化をもたらし、活性型血液凝固第 X 因子、活性型プロテイン C などの活性型血漿セリンプロテアーゼの製造に優れた効果をもたらす。

【配列番号】

atc ctt tct tca tca ttt gct ttt gca cat acg agc agt gcc gcg Ile Leu Ser Ser Ser Phe Ala-Phe Ala His Thr Ser Ser Ala Ala	288
-230 -225 -220	
cca aat aat gta ctt tca acc gaa aag tat aac aaa gaa att aaa Pro Asn Asn Val Leu Ser Thr Glu Lys Tyr Asn Lys Glu Ile Lys	333
-215 -210 -205	
tct cct gag ttt att tct gga aag ctt tca gcc cca tca tca cag Ser Pro Glu Phe Ile Ser Gly Lys Leu Ser Ala Pro Ser Ser Gln	378
-200 -195 -190	
aaa gct caa gac gtc gta ttt cat tat atg aat aca aat aaa gac Lys Ala Gln Asp Val Val Phe His Tyr Met Asn Thr Asn Lys Asp	423
-185 -180 -175	
aaa tat aaa tta gga aac gaa aat gct caa aac tca ttt aaa gtg Lys Tyr Lys Leu Gly Asn Glu Asn Ala Gln Asn Ser Phe Lys Val	468
-170 -165 -160	
aca gaa gta gtg aaa gat ccc gtt gaa caa gta acc gtt gta cgc Thr Glu Val Val Lys Asp Pro Val Glu Gln Val Thr Val Val Arg	513
-155 -150 -145	
ttg cag cag gta tat aat aat att cct gtt tgg gga tct act caa Leu Gln Gln Val Tyr Asn Asn Ile Pro Val Trp Gly Ser Thr Gln	558
-140 -135 -130	
tta gca cac gta gcg aaa gat gga acc tta aaa gtt gta tca ggt Leu Ala His Val Ala Lys Asp Gly Thr Leu Lys Val Val Ser Gly	603
-125 -120 -115	
aca gta gct cct gat tta gat aaa aag gaa aag cta aaa ggc cag Thr Val Ala Pro Asp Leu Asp Lys Lys Glu Lys Leu Lys Gly Gln	648
-110 -105 -90	
aag caa gtt gac agc aaa aag gcg att caa aca gcg gaa aaa gac Lys Gln Val Asp Ser Lys Lys Ala Ile Gln Thr Ala Glu Lys Asp	693
-95 -90 -85	
tta ggc ttt aaa ccg acg tat gaa aaa tcc cct tca tct gaa ctg Leu Gly Phe Lys Pro Thr Tyr Glu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Leu	738
-80 -75 -70	
tat gtt tat caa aat ggt tca gac aca acg tat gct tat gta gta Tyr Val Tyr Gln Asn Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Ala Tyr Val Val	783
-65 -60 -55	
aat ttg aat ttc tta aat cct gaa cca ggc aac tat tat tac ttt Asn Leu Asn Phe Leu Asn Pro Glu Pro Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe	828
-50 -45 -40	
gtt gat gct att agc ggt aaa gtg cta gat aag tac aat aca att Val Asp Ala Ile Ser Gly Lys Val Leu Asp Lys Tyr Asn Thr Ile	873
-35 -30 -25	
gat tcc gta gct ggt cca aaa gcc gat gtg aag caa gcg gca aag Asp Ser Val Ala Gly Pro Lys Ala Asp Val Lys Gln Ala Ala Lys	918
-20 -15 -10	
ccg gca gcg aaa cct gta aca ggc aca aat gct att ggc tca ggt Pro Ala Ala Lys Pro Val Thr Gly Thr Asn Ala Ile Gly Ser Gly	963
-5 -1 1 5 10	
aaa gga gtg ctt gga gat act aaa tcg tta aag aca acg tta tct	1008

Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Lys Thr Thr Leu Ser			
15	20	25	
agt tct act tac tac tta caa gat aat aca aca aga ggg ggc aca atc			1053
Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Gln Asn Asn Thr Arg Gly Ala Thr Ile			
30	35	40	
tat acg tac gat gca aaa aat cgt aca tct ctt cca ggt acg cta			1098
Tyr Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Thr Ser Leu Pro Gly Thr Leu			
45	50	55	
tgg gca gac acg gat aat acg tac aat gca acc cgc gat gca gct			1143
Trp Ala Asp Thr Asp Asn Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Asp Ala Ala			
60	65	70	
gca gta gat gct cac tat tat gca ggt gtg acg tat gat tat tat			1188
Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr			
75	80	85	
aaa aac aaa ttt aac cgc aac tcc tat gac aat gca gga gct gcg			1233
Lys Asn Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Ala Gly Ala Ala			
90	95	100	
cta aaa tca act gtt cat tat agc agc ggc tac aac aat gcg ttt			1278
Leu Lys Ser Thr Val His Tyr Ser Ser Gly Tyr Asn Asn Ala Phe			
105	110	115	
tgg aat ggc tct caa atg gta tat gga gat gga gat gga act act			1323
Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Thr Thr			
120	125	130	
ttt gtt ccg cta tca gga egg tta gat gtt atc gga cat gaa ttg			1368
Phe Val Pro Leu Ser Gly Gly Leu Asp Val Ile Gly His Glu Leu			
135	140	145	
acg cat gcg gtc aca gaa aga agt tct aat tta atc tat caa tat			1413
Thr His Ala Val Thr Glu Arg Ser Ser Asn Leu Ile Tyr Gln Tyr			
150	155	160	
gaa tca ggt gca tta aac gaa gcg att tcc gat att ttc gga aca			1458
Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr			
165	170	175	
ttg gta gaa tac tat gac aac cga aat cca gat tgg gaa att gga			1503
Leu Val Glu Tyr Tyr Asp Asn Arg Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly			
180	185	190	
gaa gat att tac acg cct gga aca agc ggt gat gcc ctt cgt tca			1548
Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Thr Ser Gly Asp Ala Leu Arg Ser			
195	200	205	
atg agc aac cca gca aaa tat gga gat ccg gat cat tat tca aag			1593
Asn Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Met Ser			
210	215	220	
cgc tat aca ggt tct agt gac aac ggc gga gtt cat aca aac agc			1638
Arg Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser			
225	230	235	
ggt att atc aac aaa gct gcc tac ttg cta gct aac gga gga acg			1683
Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ala Asn Gly Gly Thr			
240	245	250	
cat tac ggg gtt aat gta aca ggc atc ggc ggc gat aag cta ggg			1728

His Tyr Gly Val Asn Val Thr Gly Ile Gly Gly Asp Lys Leu Gly
 255 260 265
 aaa att tat tac cgt gct aat acg cta tac ttc act cag tct aca 1773
 Lys Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Leu Tyr Phe Thr Gln Ser Thr
 270 275 280
 acg ttt agc caa gcg cgt gca egt tta gta caa gct gct gat 1818
 Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Leu Val Gln Ala Ala Ala Asp
 285 290 295
 cta tac ggt tca ggc tct caa gaa gta att tca gta ggc aag tca 1863
 Leu Tyr Gly Ser Gln Glu Val Ile Ser Val Gly Lys Ser
 300 305 310

 ttt gac gca gtt ggt gtt caa 1884
 Phe Asp Ala Val Gly Val Gln
 315
 taagtataa accaaaagtc gcaagataaa tgaggtatct tacgactctc tatactacct 1944
 tactaccaat aaaggagtac tcgtataaat atattacagt actccttat tttatgttaa 2004
 taaataagga aaacagattt cttcttgatc tataaaaatc cacttcttat tcctccctt 2064
 tatgtccatt ccgaattata ctgttgcttg tttaaatgaa gaa 2107
 配列番号2
 <210>2
 <211>562
 <212>P R T
 <213>Bacillus megaterium A9542株
 <400>2
 Met Lys Lys Lys Lys Gln Ala Leu Lys Val Leu Leu Ser Val Gly
 5 10 15
 Ile Leu Ser Ser Ser Phe Ala Phe Ala His Thr Ser Ser Ala Ala
 20 25 30
 Pro Asn Asn Val Leu Ser Thr Glu Lys Tyr Asn Lys Glu Ile Lys
 35 40 45
 Ser Pro Glu Phe Ile Ser Gly Lys Leu Ser Ala Pro Ser Ser Gln
 50 55 60
 Lys Ala Gln Asp Val Val Phe His Tyr Met Asn Thr Asn Lys Asp
 65 70 75
 Lys Tyr Lys Leu Gly Asn Glu Asn Ala Gln Asn Ser Phe Lys Val
 80 85 90
 Thr Glu Val Val Lys Asp Pro Val Glu Gln Val Thr Val Val Arg
 95 100 105
 Leu Gln Gln Val Tyr Asn Asn Ile Pro Val Trp Gly Ser Thr Gln
 110 115 120
 Leu Ala His Val Ala Lys Asp Gly Thr Leu Lys Val Val Ser Gly
 125 130 135
 Thr Val Ala Pro Asp Leu Asp Lys Lys Glu Lys Leu Lys Gly Gln
 140 145 150
 Lys Gln Val Asp Ser Lys Lys Ala Ile Gln Thr Ala Glu Lys Asp
 155 160 165
 Leu Gly Phe Lys Pro Thr Tyr Glu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Leu
 170 175 180
 Tyr Val Tyr Gln Asn Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Ala Tyr Val Val

185	190	195
Asn Leu Asn Phe Leu Asn Pro Glu Pro Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe		
200	205	210
Val Asp Ala Ile Ser Gly Lys Val Leu Asp Lys Tyr Asn Thr Ile		
215	220	225
Asp Ser Val Ala Gly Pro Lys Ala Asp Val Lys Gln Ala Ala Lys		
230	235	240
Pro Ala Ala Lys Pro Val Thr Gly Thr Asn Ala Ile Gly Ser Gly		
245	250	255
Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Lys Thr Thr Leu Ser		
260	265	270
Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ala Thr Ile		
275	280	285
Tyr Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Thr Ser Leu Pro Gly Thr Leu		
290	295	300
Trp Ala Asp Thr Asp Asn Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Asp Ala Ala		
305	310	315
Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr		
320	325	330
Lys Asn Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Ala Gly Ala Ala		
335	340	345
Leu Lys Ser Thr Val His Tyr Ser Ser Gly Tyr Asn Asn Ala Phe		
350	355	360
Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Thr Thr		
365	370	375
Phe Val Pro Leu Ser Gly Gly Leu Asp Val Ile Gly His Glu Leu		
380	385	390
Thr His Ala Val Thr Glu Arg Ser Ser Asn Leu Ile Tyr Gln Tyr		
395	400	405
Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr		
410	415	420
Leu Val Glu Tyr Tyr Asp Asn Arg Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly		
425	430	435
Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Thr Ser Gly Asp Ala Leu Arg Ser		
440	445	450
Met Ser Asn Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys		
455	460	465
Arg Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser		
470	475	480
Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ala Asn Gly Gly Thr		
485	490	495
His Tyr Gly Val Asn Val Thr Gly Ile Gly Gly Asp Lys Leu Gly		
500	505	510
Lys Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Leu Tyr Phe Thr Gln Ser Thr		
515	520	525
Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Leu Val Gln Ala Ala Ala Asp		
530	535	540
Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gln Glu Val Ile Ser Val Gly Lys Ser		

545
Phe Asp Ala Val Gly Val Gln
560

【図面の簡単な説明】

【図1】 SDS-PAGEによる微生物代謝物の探索による微生物の選択

【図2】 バシロライシンMAのカルボキシルメチルセルロースクロマトグラフィーによる精製

【図3】 バシロライシンMAによるプラスミノーゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノーゲン様断片の生成

【図4】 プラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片による血管内皮細胞の増殖の阻害

550
555

【図5】 プラスミノーゲンのミニプラスミノーゲン様断片の血栓溶解酵素プラスミンへの変換効率

【図6】 バシロライシンMAによるプロウロキナーゼ(puro-uPA)活性化

【図7】 バシロライシンMAによる血液凝固第X因子の開裂と活性化

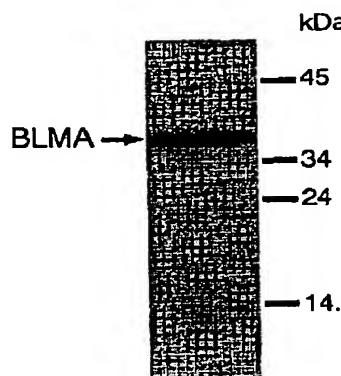
【図8】 バシロライシンMAによるプロトロンビンの活性化

【図9】 バシロライシンMAによるプロテインCの活性化

【図1】

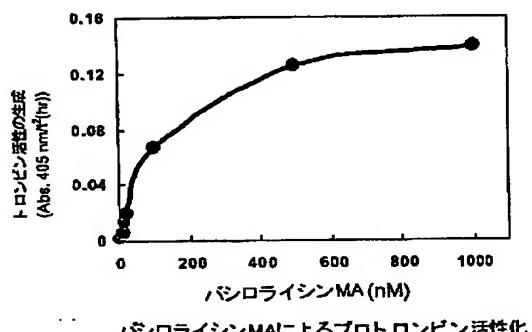


【図2】

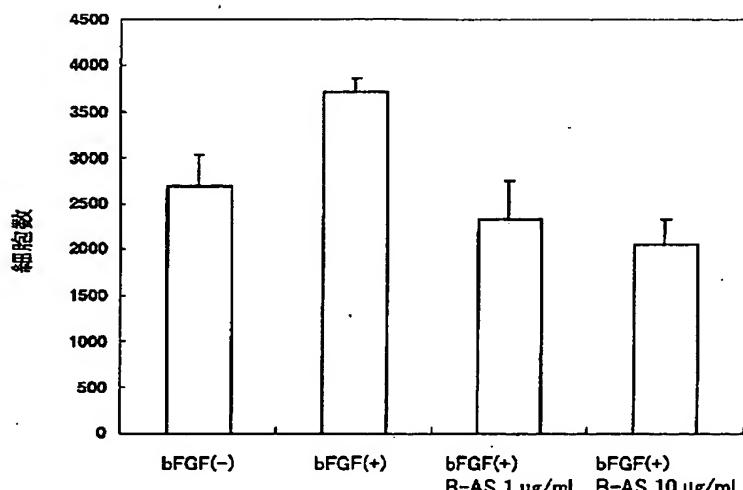


パチラス メガテリウム A9542株
からのバシロライシンMAの精製

【図8】



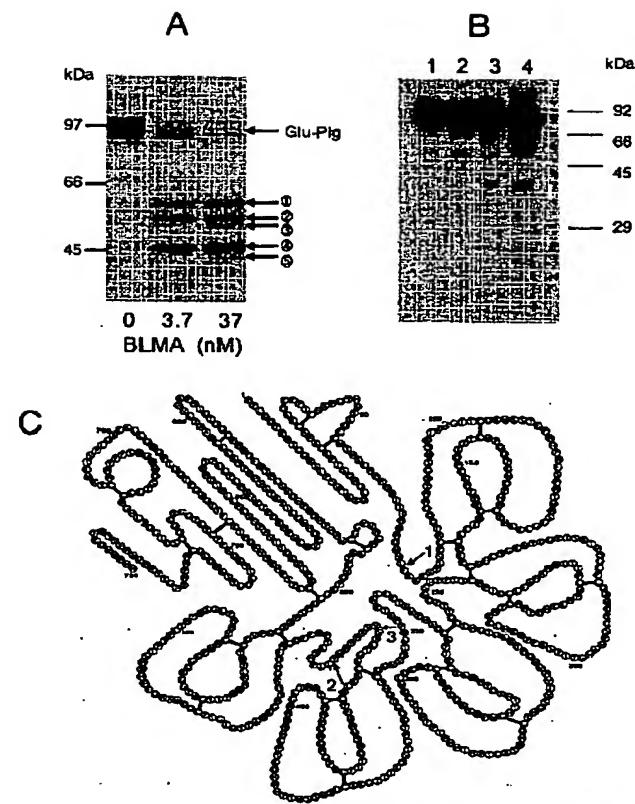
【図4】



スクリーニングの結果

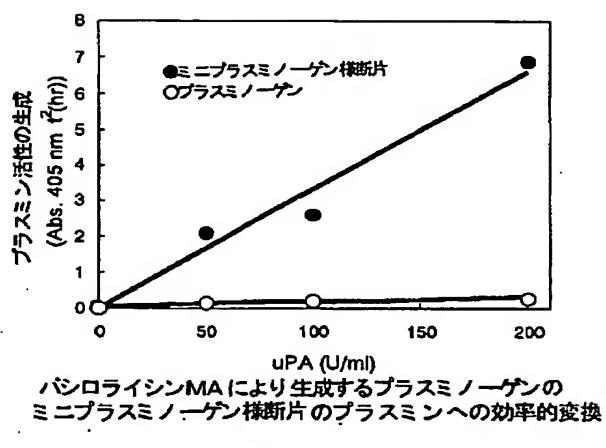
BLMAにより生成するプラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片(B-AS)
による血管内皮細胞の増殖阻害

【図3】



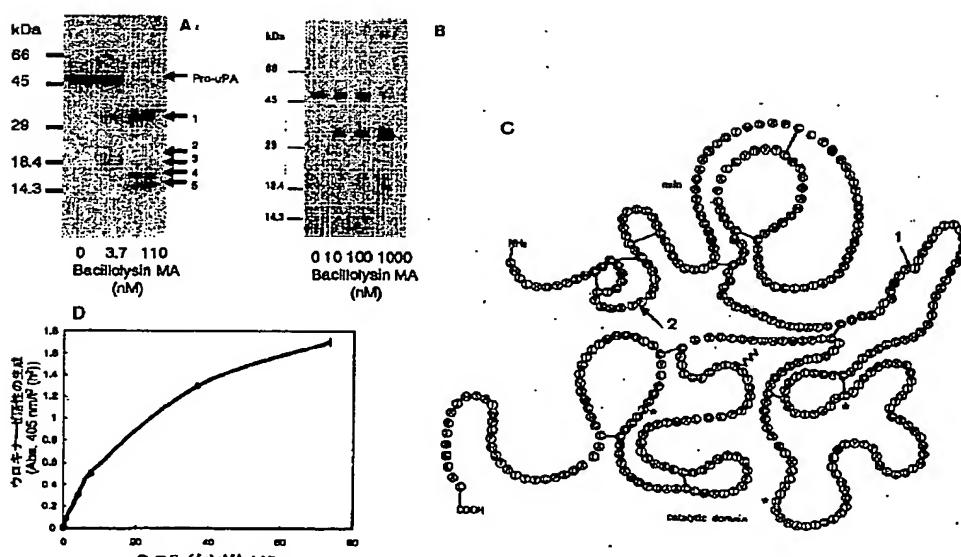
パシロライシンMAによるプラスミノーゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノーゲン様断片の生成

【図5】



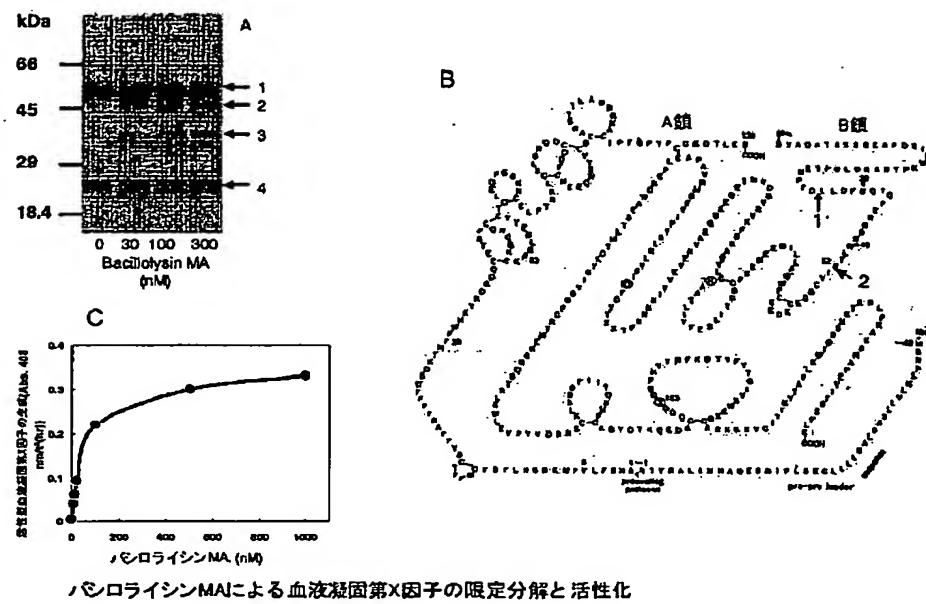
パシロライシンMAにより生成するプラスミノーゲンのミニプラスミノーゲン様断片のプラズミンへの効率的変換

【図6】



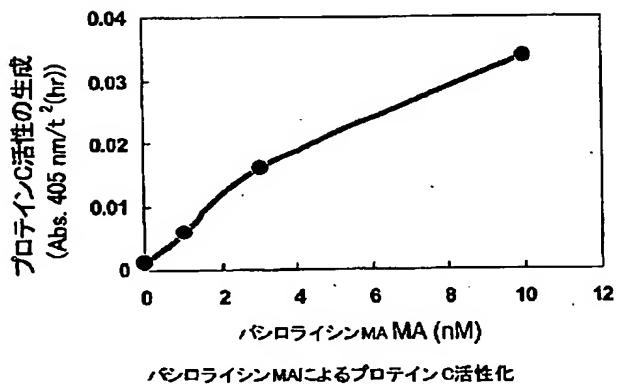
パシロライシンMAによるプロウロキナーゼの限定分解と活性化

【図7】



ノシロライシンMAによる血液凝固第X因子の限定分解と活性化

【図9】



ノシロライシンMAによるプロテインC活性化

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テ-マ-コード(参考)
A 6 1 P 43/00	1 1 1	C 1 2 N 9/54	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/54		C 1 2 P 21/02	B
15/09	Z N A	C 0 7 K 1/18	
C 1 2 P 21/02		(C 1 2 N 1/21	
// C 0 7 K 1/18		(C 1 2 R 1:07)	
(C 1 2 N 1/21		(C 1 2 N 9/54	
C 1 2 R 1:07)		C 1 2 R 1:07)	
(C 1 2 N 9/54)	
C 1 2 R 1:07)		A 6 1 K 37/47	
(C 1 2 N 15/09	Z N A	37/547	
C 1 2 R 1:07)		C 1 2 N 15/00	Z N A A

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 佐藤 勉
東京都府中市幸町2-40 B-406

Fターム(参考) 4B024 BA14 BA16 CA03 HA01
4B050 CC01 DD02 FF09E LL01
LL05
4B064 AG01 CA21 CC03 CC24 CD20
DA05
4B065 AA15X BA22 CA33 CA44
4C084 AA02 AA07 BA08 BA22 BA23
DC02 DC03 DC05 NA14 ZA362
ZA542 ZB262 ZC192
4H045 AA20 AA30 BA10 CA40 EA24
FA70 GA10 GA23

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.